

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 457**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/19** (2006.01) **A61K 39/112** (2006.01)

**A61K 39/245** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

**A61K 39/155** (2006.01)

**A61K 39/215** (2006.01)

**A61K 39/205** (2006.01)

**A61K 39/275** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61K 39/085** (2006.01)

**A61K 39/108** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06708660 .3**

96 Fecha de presentación: **07.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1858487**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **Composición de estabilizador químicamente definida**

30 Prioridad:  
**08.03.2005 EP 05101774**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.08.2012**

73 Titular/es:  
**INTERVET INTERNATIONAL BV  
WIM DE KÖRVERSTRAAT 35  
5831 AN BOXMEER, NL**

72 Inventor/es:  
**GELDER VAN, Petrus;  
LOERMANS, Arnoldus y  
MAASSEN, Mathias**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 386 457 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición de estabilizador químicamente definida

5 La presente invención se refiere a una composición de estabilizador que comprende un aminoácido y un azúcar en la que todos los compuestos están definidos químicamente; a una composición de vacuna que comprende una composición de estabilizador de este tipo y una molécula biológica y/o un microorganismo; a un método para preparar una composición farmacéutica que comprende mezclar una composición de estabilizador de este tipo con una molécula biológica y/o un microorganismo; al uso de una composición de estabilizador de este tipo y a vacunas preparadas con la misma.

10 En la industria biofarmacéutica implicada en la producción de microorganismos y moléculas biológicas como productos, la estabilidad de estos productos es una cuestión importante. Casi siempre, estos productos necesitan formularse, almacenarse y transportarse. Inevitablemente debido a las influencias experimentadas a lo largo del tiempo de cambios de temperatura y otras influencias físicas o químicas, los materiales producidos pierden su cantidad eficaz original o propiedades cualitativas deseadas. Por consiguiente, se aplican condiciones y aditivos para prevenir una pérdida de calidad y/o de cantidad eficaz de este tipo.

15 Las condiciones estabilizantes más usadas son almacenamiento a temperatura reducida, por encima o por debajo de cero °C, introducción de contenido de agua; y la liofilización es especialmente útil.

20 En la liofilización una muestra que contiene una molécula, un microorganismo, una célula o un tejido biológicamente o farmacéuticamente activo se congela en primer lugar y después se seca al vacío. Las muestras liofilizadas después se pueden almacenar a por ejemplo 4 °C y con frecuencia permanecen estables durante años. Véase para revisiones: M. Pikal, 1990 (BioPharm, vol. 3, N° 8, pág. 18-27 y N° 9, pág. 26-30); L. Gatlin, *et al.*, 1994 (Bioprocess Techn., vol. 18, pág. 317-367); J. Carpenter *et al.*, 1997 (Pharm. Research, vol. 14, pág. 969-975); F. Bedu-Addo, 2004 (Pharm. Techn., 1 de Febrero, pág. 10-18).

25 De forma ideal, un producto liofilizado tiene una calidad y cantidad del componente o componentes liofilizados que no cambia casi a lo largo de un periodo de tiempo determinado, así como también un cuerpo o torta liofilizado de aspecto atractivo y elegante, que puede resistir influencias físicas de transporte y que se disuelve rápidamente tras la reconstitución en un diluyente.

30 Para conseguir todos estos requerimientos para una muestra liofilizada y para hacer que la muestra "sobreviva" las diversas condiciones desfavorables que se producen durante el propio proceso de liofilización (congelamiento, secado, calentamiento, enfriamiento), el almacenamiento prolongado en estado liofilizado y la reconstitución, la muestra que se tiene que liofilizar habitualmente se mezcla con una composición de estabilizador antes de la liofilización.

35 Los compuestos de una composición de estabilizador se denominan comúnmente: agente de volumen, formador de torta, lioprotector, modificador de tonicidad, tensioactivo, protector criogénico, protector de congelación, desecante, agente de liofilización, etc., en los que un compuesto específico puede tener varias funciones.

40 El término "soluto compatible" también se usa para indicar un compuesto que estabiliza moléculas y organismos en condiciones de un entorno bajo en agua (M. S. da Costa *et al.* 1998, Adv. Bioch. Eng and Techn., vol. 61, pág. 117 - 153).

45 Las composiciones estabilizantes, para liofilización o para otros usos de estabilización, son mezclas complejas de proteínas, carbohidratos, lípidos y sales; cuya composición se puede adaptar para cada molécula o microorganismo que se tiene que estabilizar o para un fin específico.

50 Aunque rara vez se conoce cómo funciona exactamente un estabilizador, el hallazgo común es que compuestos grandes de peso molecular elevado generalmente proporcionan buenos efectos estabilizantes. Por lo tanto, de los principales ingredientes usados en estabilizadores fueron tales compuestos voluminosos. Para mantener los costes de material bajos los mismos se tomaron a partir de productos fácilmente disponibles de origen animal, por ejemplo: leche en polvo, triptosa, gelatina, albúmina sérica, colágeno, hidrolizado de caseína, condroitín sulfato, etc.

55 Desafortunadamente, el uso de tales compuestos de origen animal introduce potencialmente el riesgo de contaminación con agentes extraños de un producto de otra manera estéril o controlado. Esta ha sido una preocupación principal desde el descubrimiento de enfermedades zoonóticas intraespecies y las enfermedades relacionadas con prión recientemente descubiertas. Como resultado, las autoridades reguladoras han exigido un ensayo de seguridad exhaustivo de productos biológicos (estabilizados) para determinar la ausencia de agentes extraños antes de su comercialización.

60 Esto ha conducido al abandono del uso de tales componentes animales, inicialmente únicamente en el medio de cultivo usado en la producción de las moléculas biológicas o microorganismos. Por ejemplo, B. Makoschey *et al.*

(2002, Cytotechnology vol. 39, pág. 139-145), describen un estabilizador de liofilización para su uso en virus estabilizantes que se había producido sin suero; el estabilizador comprendía azúcares, aminoácidos, gelatina y péptidos a partir de un hidrolizado de proteína de origen animal.

5 Más tarde, también los estabilizadores que se usan posteriormente después de la producción, se modificaron en su composición; como resultado, se desarrollaron composiciones de estabilizador que son: sin suero (sin suero animal); sin proteína (sin proteína animal, pero puede contener otros componentes obtenidos de animales) o incluso sin compuesto animal (ACF) (que no contiene ningún componente obtenido de un animal).

10 El documento US3915794 divulga composiciones estabilizantes que comprenden virus, polivinilpirrolidona, sacarosa, glutamato y edetato de sodio.

Sin embargo, en las composiciones de estabilizador, permanecía la necesidad de moléculas grandes de peso molecular elevado para su efecto estabilizante. Por lo tanto, se obtuvieron compuestos voluminosos para  
15 estabilizadores ACF por ejemplo a partir de origen vegetal o microbiano, tales como: yeastolato, peptona de soja, gelatina recombinante, (hidroxi-etil-) almidón, alginato, etc.

Como alternativa, se emplean compuestos poliméricos grandes de origen natural o sintético tales como: polisacáridos, polivinilpirrolidona, ficol, polilisina, polietilenglicol, (carboxi) metil-celulosa, dextrano, polisorbato (por  
20 ejemplo, Tween<sup>®</sup> 80), etc. Por ejemplo T. Osterberg *et al.* (1997, Pharm. Res., vol. 14, pág. 892-898), reemplazaron albúmina sérica por Tween<sup>®</sup> 80 como compuesto estabilizante para proteína de Factor VIII.

Sin embargo, existen varios problemas incluso con estos compuestos de estabilizador ACF. Por ejemplo, varios de  
25 estos compuestos estabilizantes no son resistentes a esterilización por calor y debido a que la esterilidad de la composición de estabilizador es con frecuencia un requerimiento absoluto, la única manera de conseguir esto es entonces mediante el proceso más tedioso de esterilización con filtro.

También, en el caso de que el producto estabilizado se tenga que administrar a un ser humano o animal diana,  
30 algunos de los compuestos de estabilizador ACF no se pueden usar ya que los mismos son tóxicos o pueden causar reacciones alérgicas.

Sin embargo el problema más importante en todos estos casos es que las composiciones de estabilizador, incluso  
cuando son ACF, aún comparten la desventaja común de que los mismos contienen o consisten en constituyentes desconocidos, heterogéneos y poco definidos. Por ejemplo a la composición de los hidrolizados de productos  
35 vegetales naturales no se conoce para nada. De forma similar, para las estructuras poliméricas mencionadas, su estructura química se conoce únicamente en términos generales; los compuestos usados están definidos únicamente en el sentido en que los mismos tienen un peso molecular promedio o una longitud promedio de las cadenas laterales. Estas moléculas por lo tanto comprenden realmente una familia de estructuras químicas, con una amplia diversidad de moléculas.

40 Por lo tanto tales compuestos aún son de naturaleza poco definida y tienen variación de lote a lote. Esto exige selección cuidadosa de los compuestos de partida para lotes adecuados para producción de una composición de estabilizador. Los lotes de compuestos que tienen la calidad deseada después tienen disponibilidad limitada.

45 El uso de tales compuestos poco definidos en composiciones estabilizantes provoca variaciones desconocidas e incontrolables en la composición, calidad y rendimiento de los productos que se estabilizan mediante estas composiciones.

Una calidad de producto incontrolable de este tipo es altamente indeseable en una industria que está tratando de  
50 producir productos consistentes, seguros y de alta calidad y únicamente se puede superar mediante procedimientos costosos y que consumen mucho tiempo de selección de materiales brutos, verificación de productos entrantes, liberación de producto y control de calidad de producto final.

55 El objeto de la invención es proporcionar una composición de estabilizador alternativa y mejorada que no sufra de estas desventajas de la técnica anterior.

De forma sorprendente se ha observado que una composición de estabilizador que comprende al menos un aminoácido y al menos un azúcar, en la que todos los compuestos están químicamente definidos, puede  
60 proporcionar estabilización eficaz de la calidad y la cantidad de moléculas biológicas y de microorganismos, sin la necesidad de compuestos de peso molecular elevado, grandes o poco definidos. Esto proporciona muchas ventajas con respecto a la técnica anterior.

La composición estabilizante de la invención no contiene suero, no tiene proteína y no contiene compuesto animal y por lo tanto no introduce ningún agente extraño en el producto controlado que se tiene que estabilizar. También la  
65 composición estabilizante obvia la necesidad de incorporación de compuestos heterogéneos poco definidos o desconocidos, esto da como resultado estabilización de producto que conduce a productos finales predecibles y

controlables. Ambos aspectos reducen los requerimientos de control de los productos finales para calidad y agentes extraños.

5 La composición estabilizante comprende únicamente compuestos exactamente conocidos, que no sufren de variación de lote a lote o disponibilidad limitada de lotes con características favorables requeridas. Esto reduce los requerimientos del control de entrada y selección de materiales de partida. Además, la composición estabilizante de acuerdo con la presente invención es no tóxica para dirigirse a seres humanos o animales y es esterilizable por calor.

10 La composición estabilizante proporciona buena estabilización de moléculas biológicas y de microorganismos frente a influencias físicas y químicas, en particular la misma estabiliza la calidad y cantidad eficaz de tales muestras frente a las influencias negativas experimentadas a lo largo del tiempo y a través de cambios de temperatura.

15 Cuando se usa en liofilización, la composición estabilizante estabiliza moléculas biológicas y microorganismos frente a los condiciones de proceso de congelamiento, secado, calentamiento, enfriamiento, así como también frente a cualquier influencia negativa durante almacenamiento prolongado en estado liofilizado y en reconstitución.

20 También la composición estabilizante proporciona un cuerpo o torta liofilizado que es de aspecto atractivo y elegante, que puede resistir las influencias físicas de transporte y que se disuelve rápidamente tras la reconstitución en un diluyente.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 y a una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7.

25 Una "composición de estabilizador" se define como una composición que cuando se mezcla con moléculas biológicas o microorganismos tiene un efecto estabilizante; es decir, la composición de estabilizador puede evitar en un grado grande la pérdida de calidad o cantidad eficaz de muestras que contienen moléculas biológicas y/o microorganismos.

30 La "cantidad eficaz" es por ejemplo la cantidad de moléculas biológicamente o farmacéuticamente activas o el número de microorganismos vivos o infecciosos.

35 La "pérdida de calidad" puede de otra forma haber ocurrido mediante influencias físicas y/o químicas, tales como a lo largo del tiempo mediante variación de temperatura, influencia mecánica (por ejemplo transporte) y/o cambios en la forma física (por ejemplo, congelamiento, secado).

40 La composición de estabilizador puede estar en forma de una solución acuosa, un concentrado acuoso o se puede proporcionar como una mezcla seca de químicos adecuada para preparar una solución acuosa o un concentrado acuoso de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención.

El virus que se tiene que estabilizar puede estar en forma líquida, seca, congelada o liofilizada, antes de la mezcla con la composición de estabilizador.

45 El virus puede estar vivo o muerto, por ejemplo como resultado de inactivación deliberada.

Un "azúcar" se conoce generalmente que es un compuesto que proporciona un sabor dulce o adulado y más específicamente es un carbohidrato tal como un mono o disacárido, un alcohol de azúcar o un poliol y derivados de los mismos.

50 Para la invención, un compuesto está "químicamente definido" cuando el mismo consiste exclusivamente en moléculas idénticas.

Un compuesto químicamente definido de este tipo por lo tanto tiene una estructura química específicamente conocida, no ambigua y uniforme y se usa en una cantidad específicamente conocida.

55 Un compuesto químicamente definido del estabilizador de acuerdo con la invención, por lo tanto, no es un compuesto poco definido, heterogéneo o desconocido tal como lisado proteináceo, extracto, hidrolizado o mezclas de péptido. También, la composición de estabilizador de acuerdo con la invención no comprende un compuesto polimérico, del cual únicamente se conoce un peso molecular promedio o una longitud promedio de las cadenas laterales.

60 Un compuesto químicamente definido del estabilizador de acuerdo con la invención está fácilmente disponible a partir de proveedores comerciales de químicos finos; preferentemente se emplea la pureza más elevada disponible. Sin embargo, el requerimiento de estar químicamente definido no excluye la presencia de cantidades trazas de impurezas en un compuesto de este tipo. Tales impurezas son por ejemplo metales pesados, restos, disolventes o similares. Preferentemente tales impurezas están presentes en una cantidad de menos del 1% en peso del

compuesto químicamente definido, más preferentemente menos del 0,1, 0,01, 0,001 ó el 0,0001% en peso.

5 Preferentemente, el requerimiento de ser químicamente definido se refiere a las moléculas de un compuesto del estabilizador de acuerdo con la invención, cuando están en forma ionizada en una solución acuosa. Por consiguiente, en una realización preferida un compuesto químicamente definido de este tipo puede estar en su forma sólida o no ionizada presente en diferentes formas de sal o en formas que tienen un número diferente de moléculas de agua cristalina unidas (formas de hidrato).

10 Preferentemente, la composición de estabilizador de acuerdo con la invención proporciona estabilización de virus a al menos el mismo nivel que los estabilizadores de la técnica anterior que comprenden compuestos poco definidos.

15 Preferentemente la pérdida de título cuando se usa la composición de estabilizador de acuerdo con la invención para estabilización de un producto que contiene un microorganismo vivo, es menos de 1 Log<sub>10</sub>. Más preferente menos de 0,5 Log<sub>10</sub>.

20 Sin embargo esto no es siempre necesario: para algunas aplicaciones, el no tener compuestos poco definidos en el estabilizador y por consiguiente en el producto final es de importancia fundamental; un rendimiento ligeramente inferior en la calidad y/o la cantidad que se produce como resultado del uso de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención es en ese caso perfectamente aceptable a cambio de las muchas ventajas que esto ofrece con respecto a los estabilizadores de la técnica anterior.

25 Este es, por ejemplo, el caso en el que se usa un estabilizador como estabilizador para almacenamiento a largo plazo de material de siembra de microorganismos, tal como en reservas de glicerol. En ese caso la estabilización ACF mediante un estabilizador completamente definido puede ser más importante y una pérdida en el título de hasta 2 Log<sub>10</sub> puede ser aceptable, ya que tal material normalmente se cultivará hasta la cantidad correcta para inoculación de un nuevo cultivo de todas maneras.

30 Además, un experto es perfectamente capaz de optimizaciones adicionales a, por ejemplo, la composición de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención o las condiciones para su uso, mediante experimentación de rutina.

35 Para evaluar el nivel de estabilización, correspondiente a la cantidad restante eficaz y la calidad del producto estabilizado, se puede usar cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, la cantidad y virulencia (por ende la calidad) de compuestos virales y bacterianos se puede cuantificar mediante titulación o dilución limitante; moléculas biológicas se pueden detectar bioquímicamente (por ejemplo enzimáticamente), inmunológicamente (ensayos de inmunofluorescencia) o físicamente (por ejemplo electroforesis, cromatografía o espectrometría de masas). Todas estas técnicas se conocen bien y están disponibles en la técnica.

40 En una realización preferida, la composición de estabilizador de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos una poliamina, seleccionada entre el grupo que consiste en cadaverina, putrescina, espermidina y espermina.

Una "poliamina" se define como un compuesto con dos o más grupos amino.

45 En realizaciones más preferidas, la invención se refiere a una composición de estabilizador de acuerdo con la invención:

- en la que el azúcar es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, sorbitol y manitol;
- 50 - en la que la poliamina es al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en cadaverina, putrescina, espermidina y espermina;
- en la que el aminoácido es glutamina (ácido glutámico) o glicina o la que comprende ambos de estos aminoácidos.

55 En una realización adicional más preferida, la composición de estabilizador de acuerdo con la invención es una solución acuosa tamponada; preferentemente la solución acuosa está tamponada entre pH 6-8, más preferentemente a aproximadamente pH 6,9.

60 El tampón puede ser por ejemplo Tris / citrato, preferentemente a una concentración de aproximadamente 50 mM / 10 mM.

Preferentemente el tampón está basado en fosfato, más preferente fosfato disódico dihidrato.

65 Preferentemente el tampón está presente en una cantidad de entre 0,1 y 100 g/l, más preferentemente aproximadamente 1 g/l.

5 En una realización más preferida alternativa, la solución acuosa de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención es una solución concentrada, que comprende los compuestos de la composición de estabilizador en una concentración que es más elevada que la concentración a la cual estos compuestos estarán en la composición farmacéutica final que se forma tras la mezcla de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención con las moléculas biológicas o los microorganismos que se tienen que estabilizar.

10 Preferentemente la composición de estabilizador está concentrada 2x, 3x, 4x, 5x, 10 ó 20x en comparación con la concentración o la cantidad en la composición farmacéutica final; más preferentemente la composición de estabilizador está concentrada 4x.

10 En una realización más preferida, se proporciona una composición de químicos seca que es adecuada para disolución en un disolvente apropiado, para preparar una solución acuosa o un concentrado de la composición de estabilizador de la invención.

15 La proporción de una mezcla seca de químicos para disolución posterior tiene las ventajas de almacenamiento en un volumen más pequeño. Esto ahorra espacio de almacenamiento y facilita el transporte y la comercialización.

Aún más preferentemente, en la composición de estabilizador de acuerdo con la invención:

- 20 - el azúcar es sacarosa, sorbitol o manitol; preferentemente sorbitol; más preferentemente D-sorbitol;  
 - el aminoácido es glutamato o glicina; más preferentemente L-glutamato; aún más preferentemente comprende tanto glutamato como glicina;  
 - se usa una combinación de poliaminas; más preferentemente espermina y putrescina o espermina y etileno diamina.

25 En una realización adicional más preferida de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención, el concentrado 4x comprende:

- 30 - el azúcar en una cantidad de entre 10 y 200 g/l, preferentemente a aproximadamente 75 g/l;  
 - el aminoácido en una cantidad de entre 0,1 y 40 g/l; preferentemente L-glutamato está comprendido a aproximadamente 20 g/l o glicina está comprendida a aproximadamente 160 g/l;  
 - la poliamina en una cantidad de entre 0,1 y 100 g/l; preferentemente espermina está comprendida a aproximadamente 10 g/l o espermidina está comprendida a aproximadamente 2,5 g/l;

35 En una realización preferida adicional, la composición de estabilizador de acuerdo con la invención, comprende un azúcar y glutamato como aminoácido y adicionalmente comprende al menos un soluto compatible. El soluto compatible preferentemente es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en sarcosina, betaína, diglicina y colina. El soluto compatible en el concentrado 4x está presente preferentemente en una cantidad de entre 0,1 y 400 g/l; preferentemente entre 50-200 g/l, más preferentemente a aproximadamente 160 g/l.

40 Como se ha descrito anteriormente, es irrelevante en qué forma de sal o hidrato se usa un compuesto de la composición de estabilizador; por ejemplo se puede usar espermina en las formas de: espermina, dihidrato de espermina o tetraclorhidrato de espermina; de forma similar, se puede emplear espermidina como espermidina o como triclorhidrato de espermidina.

45 Como el estabilizador de acuerdo con la invención tiene por objeto mezclarse con virus, en algunos usos, los compuestos del estabilizador pueden ser parte de un producto que se administra a un ser humano o animales diana. Por lo tanto, los compuestos de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención preferentemente son no tóxicos, al menos: no tóxicos en las concentraciones presentes en el producto final que se tiene que administrar.

50 Preferentemente los compuestos de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención no inducen una reacción alérgica indeseada.

55 Preferentemente, la composición de estabilizador de acuerdo con la invención es estéril. La esterilización del estabilizador de acuerdo con la invención se puede conseguir mediante calor, filtración, radiación o cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Preferentemente la composición de estabilizador se esteriliza por calor.

60 A modo de ejemplos no limitantes, los compuestos químicamente definidos adecuados para su uso en la composición de estabilizador de acuerdo con la invención se enumeran en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Compuestos químicamente definidos adecuados para su uso en la composición de estabilizador de acuerdo con la invención

Producto	Proveedor	Nº de catálogo
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	Merck	6576
D-Sorbitol	Sigma	S7547
Na-L-Glutamato mono-hidrato	Merck	6445
Glicina	Sigma	G8790
Espermina	Fluka	85590
Tetraclorhidrato de espermina	Fluka	85610
Dihidrato de espermina	Fluka	85588
Espermidina	Fluka	85561
Triclorhidrato de espermidina	Fluka	85580
Putrescina	Sigma	P7505
Etileno diamina	Aldrich	19.580-4
Tris-HCl (Trishidroximetil-aminometano)	Merck	8382
tri-Na Citrato dihidrato	Merck	6447
Sarcosina	Sigma	S7672
Betaína	Sigma	B7045
Di-glicina	Sigma	G3915
Colina	Sigma	C2004

5 Como se conoce en la técnica, los derivados de los compuestos descritos en el presente documento de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención, están disponibles o se pueden sintetizar.

**Tabla 2:** Visión de conjunto de las composiciones de estabilizador preferidas y más preferidas de acuerdo con la invención. Las cantidades proporcionadas corresponden a las de un concentrado 4x:

		Cantidad en g/l en un concentrado 4x	
		Preferido	Mas preferido
Tampón		0,1 -100	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	ídem	1
	o Tris/Citrato	id.	50 mM/10 mM
Azúcar		10-200	
	Sorbitol	id.	75
Aminoácido		0,1 -400	
	Glutamato	id.	20
	y/o Glicina	id.	160
Poliamina		0,1 -100	
	Espermina	id.	10
	o Espermidina	id.	2,5
	o Putrescina	id.	10
	o Etileno-diamina	id.	10
	o combinaciones: espermina y putrescina o espermina y etileno diamina		10 5 10 5
Soluto compatible		0,1 -400	
	Sarcosina	id.	160
	o Betaína	id.	160
	o Di-glicina	id.	160
	o Colina	id.	160
pH		6-8	6,9

Se realizó una gran cantidad de experimentos con composiciones de estabilizador de acuerdo con la invención. Estos se diseñaron para incluir todas las condiciones en las cuales la composición de estabilizador de acuerdo con la invención proporciona estabilización eficaz:

- 5 - enfriamiento; para almacenamiento de producto (a granel) en forma líquida a por ejemplo 4 °C
- congelamiento; para almacenamiento de producto (a granel) ultracongelado, a por ejemplo -20 °C o -45 °C
- liofilización; que incluye: secado, calentamiento, enfriamiento
- congelamiento de producto liofilizado; para almacenamiento ultracongelado, a por ejemplo -20 °C o -45 °C
- enfriamiento de producto liofilizado; para almacenamiento a 4 °C
- 10 - calentamiento de producto liofilizado, hasta temperaturas por encima de la temperatura ambiente y
- reconstitución del producto liofilizado en un diluyente

15 Cuando estos experimentos se realizaron con composiciones estabilizadas que comprenden microorganismos, el número restante de microorganismos infecciosos vivos en los productos reconstituidos se determinó usando técnicas de cuantificación bien conocidas basadas en titulación o dilución limitante. Cuando se realizaron con moléculas biológicas, la calidad y cantidad se determinaron usando ensayos específicos tales como titulación, ELISA o bioensayos.

20 Estos experimentos y sus resultados se resumen en los ejemplos y muestran que la composición de estabilizador de acuerdo con la invención proporciona estabilización eficaz de virus, no sólo para los diversos usos en y alrededor de liofilización, sino también para estabilización de antígeno a granel en almacenamiento enfriado o congelado, antes de o en lugar de liofilización.

25 Una composición de estabilizador se puede caracterizar por que no comprende compuestos de peso molecular elevado o de gran tamaño.

30 Para la invención, compuestos de "peso molecular elevado" y "grandes", se definen como cualquier compuesto que tiene un peso molecular de tamaño del ión molecular que supera 203 Da. Por ejemplo, la espermina no sería un compuesto grande de este tipo, ya que su ión molecular tiene un peso molecular de únicamente 202 Da, cuando se excluye cualquier agua cristalina o formas de sal, tales como hidratos o clor(hidratos).

35 Como se ha descrito anteriormente, ha sido sorprendente encontrar que ninguno de los compuestos voluminosos usados comúnmente en la técnica es necesario para conseguir estabilización eficaz, de hecho no se necesita ningún compuesto más grande que espermina.

40 También se han mencionado las ventajas de esto; los compuestos de peso molecular elevado y grandes con frecuencia son poco definidos y heterogéneos o en el mejor de los casos son compuestos de los cuales se conoce únicamente un peso molecular promedio o una longitud promedio de las cadenas laterales. Por consiguiente, tales compuestos poco definidos usados en una composición de estabilizador darán como resultado un producto estabilizado con características impredecibles.

En una realización preferida alternativa, la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende una composición de estabilizador de acuerdo con la invención y al menos un virus.

45 Una composición de vacuna se conoce comúnmente en la técnica que representa una composición que comprende un compuesto inmunogénico en un vehículo farmacéuticamente aceptable, compuesto inmunogénico que es capaz de inducir una activación pasiva o activa del sistema inmune de una diana. La respuesta inmune inducida tiene por objeto interferir con el establecimiento o la progresión de una infección determinada o aliviar síntomas de enfermedad.

50 Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo agua estéril o una solución salina fisiológica estéril. En una forma más compleja el vehículo puede ser, por ejemplo, un tampón.

55 Una "molécula biológica" se comprende que es una molécula que se puede encontrar en la naturaleza; en particular esto se refiere a una proteína, carbohidrato, lípido o ácido nucleico. El origen de la molécula puede ser biológico o sintético, obtenido *ex vivo* o *ex vitro*.

60 El término "proteína" tiene por objeto incluir una cadena molecular de dos o más aminoácidos; por lo tanto los péptidos, oligopéptidos y polipéptidos están incluidos dentro de la definición de proteína.

La composición de vacuna de acuerdo con la invención puede estar en cualquier forma, por ejemplo: liofilizada, líquida o congelada; o se puede formular o procesar hasta un líquido, un gel, un ungüento, un polvo, un comprimido, una cápsula o un cuerpo liofilizado dependiendo del método deseado de almacenamiento, transporte o aplicación a la diana.

65

La composición de vacuna de acuerdo con la invención puede comprender microorganismos inmunogénicos únicos y moléculas biológicas o combinaciones de los mismos.

En realizaciones preferidas, la invención se refiere a una composición de vacuna:

- en la que el microorganismo es un virus o en la que están comprendidos tanto un virus como una bacteria; más preferentemente el virus es al menos una especie viral seleccionada entre el grupo que consiste en herpes-, paramixo-, ortomixo-, adeno-, rabdo-, birna-, corona-, neumo- y poxvirus; aún más preferentemente el virus se selecciona entre el grupo que consiste en virus de herpes Bovino, virus de parainfluenza bovina 3, virus de pseudorabia, virus sincitial respiratorio humano y virus de influenza humana o animal.

Los fragmentos de anticuerpo son por ejemplo fragmentos Fab y anticuerpos de cadena única. Las hormonas para su uso con la composición de estabilizador de la invención son por ejemplo insulina, hormonas gonadotróficas tales como hormona foliculo estimulante, gonadotropina coriónica humana y eritropoyetina.

Las vacunas y composiciones de estabilizador de la invención son aplicables con una amplia diversidad de virus, de cualquier tipo genómico o morfológico, infecciosos para cualquier especie animal o para seres humanos. En particular, cualquier resultado presentado acerca de la estabilización de un virus animal particular se puede extrapolar directamente para predecir los resultados de estabilización del virus correspondiente que infecta a otra especie hospedadora, animal o ser humano y a las otras especies virales dentro de esta familia viral.

Los virus que tienen una envuelta viral son particularmente sensibles a influencias químicas y físicas. Por consiguiente, como tales virus se pueden estabilizar eficazmente por la composición de estabilizador de la invención, esto demuestra su eficacia aún más.

**Tabla 3:** Ejemplos de virus para su uso con la composición de estabilizador de la invención

familia	ejemplo	genoma	con envuelta
herpes	virus de herpes bovino (BHV) *	ADN bc	sí
id.	virus de pseudorabia (PRV)	id.	sí
pox	mixomavirus	id.	sí
paramixo	virus de parainfluenza bovina 3 (PI3)	ARN mc, cadena negativa	sí
neumo	virus sincitial respiratorio bovino (BRSV)	id.	sí
ortomixo	virus de influenza equino (EIV)	id., segmentado	sí
corona	coronavirus bovino (BCV)	ARN mc, cadena positiva	sí
* El virus de herpes bovino también se conoce como virus de rinotraqueitis infecciosa bovina			

Las bacterias para su uso con el estabilizador pueden ser de cualquier tipo, por ejemplo según se caracteriza mediante tinción Gram positiva o Gram negativa.

**Tabla 4:** Ejemplos de bacterias para su uso con la composición de estabilizador de la invención:

característica	nombre
Gram positiva	<i>Streptococcus equi</i>
id.	<i>Staphylococcus camosus</i>
Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>
id.	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
id.	<i>Salmonella gallinarum</i>

Los resultados obtenidos para estabilizar estas bacterias se pueden extrapolar a otras especies bacterianas dentro de los géneros mencionados.

El sistema de producción usado para producir moléculas biológicas y microorganismos para su uso con el estabilizador de la invención puede ser cualquier sistema *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo se pueden producir virus en un cultivo celular, en huevos de pollo fertilizados o en un animal hospedador; las bacterias se pueden producir usando técnicas similares y adicionalmente en caldo de cultivo y las moléculas biológicas se pueden producir mediante aislamiento a partir de un animal o microorganismo, especialmente sistemas de expresión recombinantes que se pueden usar provechosamente. Se conocen muchas otras realizaciones en la técnica.

Sin embargo, la seguridad óptima y previsibilidad del producto final estabilizado se consigue eliminando constituyentes desconocidos, heterogéneos y poco definidos tanto de la fase de producción como de la composición

de estabilizador.

Por lo tanto, en una realización más preferida de la composición de vacuna de acuerdo con la invención, el virus se produce sin componentes animales.

5 Los sistemas de producción ACF por ejemplo son cultivos virales en células en medio ACF; cultivos bacterianos en un caldo de cultivo ACF; y cultivos de expresión recombinante que usan medios ACF, por ejemplo el sistema de expresión de baculovirus que usa células de insecto.

10 En una realización preferida adicional, la composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un adyuvante.

15 Los adyuvantes se usan comúnmente para reforzar la respuesta inmune a un componente de vacuna, estimulando el sistema inmune de un ser humano o animal diana, de una manera inespecífica. Se conocen en la técnica muchos adyuvantes diferentes, por ejemplo: aceites minerales o biológicos, saponinas, péptidos, alúmina y derivados, etc.

En una realización preferida adicional, la composición de vacuna de acuerdo con la invención está liofilizada.

20 En forma liofilizada la composición de estabilizador de la invención será lo más beneficioso; las composiciones de vacuna liofilizadas de acuerdo con la invención son estables a por ejemplo +4 °C durante meses a varios años.

25 Los procedimientos de liofilización se conocen en la técnica; el equipo para liofilización a diferentes escalas está disponible en el mercado. Típicamente las composiciones de vacuna que comprenden un estabilizador de acuerdo con la invención se cargan en recipientes tales como viales de vidrio hasta un volumen determinado, por ejemplo entre 0,5 y 50 ml, preferentemente 1, 2 ó 5 ml. Posteriormente estos viales se congelan y se envían a un proceso de liofilización.

Una descripción de un proceso de liofilización ilustrativo comprende las etapas de:

- 30 - liofilización durante 10-60 minutos, para fijar el líquido a una estructura determinada;  
 - primera etapa de secado a -20 a 20 °C, durante 1-12 horas, a vacío elevado, para sublimar el agua cristalizada;  
 - secado secundario a 0 a 40 °C, durante 1/2-6 horas, a vacío medio, para desorción de agua no congelada;  
 35 - empaquetamiento de los cuerpos liofilizados (por ejemplo cierre de viales de vidrio mediante un tapón de goma) para mantener condiciones secas, por ejemplo en vacío o en gas nitrógeno; y  
 - mantenimiento +4 °C.

40 El experto es muy capaz de variaciones de rutina y optimizaciones de un proceso de este tipo con el fin de conseguir los mejores resultados para un tipo específico de muestra.

El proceso de liofilización se puede optimizar controlando la temperatura y el contenido de agua en el aparato durante el secado. También, se usa de forma rutinaria calorimetría de exploración diferencial para evaluar las características del producto antes y después de la liofilización.

45 El contenido de agua residual (car) en el producto final es un parámetro importante que determina la estabilidad de los productos liofilizados. Preferentemente el car de muestras liofilizadas y vacunas de acuerdo con la invención está por debajo del 5%. Para determinar el car, se puede emplear provechosamente la titulación de Karl Fischer conocida en la técnica.

50 En una realización preferida adicional, se prepara una vacuna liofilizada de acuerdo con la invención en forma de una lioesfera como se describe en la patente Europea EP 799.613.

55 El cuerpo liofilizado producido de una composición de vacuna de acuerdo con la invención puede ser de cualquier forma. La composición estabilizante de acuerdo con la invención proporciona características beneficiosas a la composición de vacuna para conseguir un aspecto elegante y atractivo del cuerpo liofilizado. Preferentemente la torta liofilizada en un vial de vidrio tiene un aspecto brillante y homogéneo y preferentemente se mantiene unida a la pared del vial después de agitarlo y no es demasiado frágil que se pueda pulverizar en condiciones de transporte normal.

60 Por consiguiente, el aspecto deseado del cuerpo de vacuna liofilizado no sólo se refiere a características subjetivas o estéticas, sino también comprende efectos técnicos provechosos genuinos; en particular la eficacia de estabilización, la resistencia a los rigores de transporte y la velocidad de redisolución están incluidas.

65 Es de especial interés evitar un aspecto conocido en la técnica como "colapsado", ya que los cuerpos liofilizados que tienen un aspecto de este tipo amorfo y en grumos se disuelven lentamente y de forma completa y no proporcionan esta realización adecuada de las moléculas biológicas y/o microorganismos que se tienen que conservar.

En una realización preferida adicional, se puede obtener una solución de vacuna lista para su uso reconstituyendo una composición de vacuna liofilizada de acuerdo con la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Ya que las composiciones de vacuna liofilizadas de acuerdo con la invención se disuelven rápidamente, la reconstitución preferentemente se realiza inmediatamente antes de que la solución de vacuna se aplique a una diana. Esto determina que la solución de vacuna sea fresca y con la dosis y calidad pretendida.

10 La composición de vacuna de acuerdo con la invención se puede administrar a una diana humana o animal de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo mediante aplicaciones parenterales tales como a través de todas las vías de inyección en o a través de la piel: por ejemplo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, submucosal o subcutánea. Las vías alternativas de aplicación que son factibles son mediante aplicación tópica como una gota, pulverización, gel o ungüento al epitelio mucosal del ojo, nariz, boca, ano o vagina o a la epidermis de la piel exterior en cualquier parte del organismo; mediante pulverización como un aerosol o polvo. Como alternativa, la aplicación puede ser a través de la vía alimentaria, combinándola con el alimento, pienso o agua de bebida por ejemplo, como un polvo, un líquido o un comprimido o mediante administración directamente a la boca como un líquido, un gel, un comprimido o una cápsula o al ano como un supositorio. También se puede aplicar provechosamente vacunación por inmersión.

20 Las vías de aplicación preferidas son inyección intramuscular o subcutánea o pulverización intranasal.

No hace falta decir que la vía óptima de aplicación dependerá de las particularidades específicas de la infección o de los síntomas que se tienen que prevenir o aliviar, las características de la formulación de vacuna que se use y las características particular de la especie diana.

25 El esquema de aplicación de la composición de vacuna de acuerdo con la invención al ser humano o animal diana puede ser en dosis única o múltiples, que se pueden proporcionar al mismo tiempo o secuencialmente, de una manera compatible con la dosificación y formulación y en una cantidad tal que sea inmunológicamente eficaz, por ejemplo, como una dosis anual única.

30 La composición farmacéutica preparada de acuerdo con el método de la invención puede ser en cualquier forma: líquida o seca, congelada, liofilizada, etc.

La mezcla se puede realizar usando cualquier técnica adecuada disponible en la técnica.

35 Preferentemente el método de acuerdo con la invención comprende mezclar 1 parte de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención como una solución tamponada acuosa estéril a concentración 4x, con 3 partes de una composición que comprende al menos una molécula biológica y/o al menos un microorganismo, para producir una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

40 La composición que comprende al menos un virus que se tiene que mezclar con la composición de estabilizador de acuerdo con la invención, está preferentemente en forma líquida. Esta composición se puede obtener a partir de un cultivo viral o un cultivo de sistema de expresión. Esta composición se puede obtener, por ejemplo, después de procesamiento aguas abajo, tal como centrifugación, por ejemplo se puede usar el sobrenadante de cultivo o el sedimento centrifugado (resuspendido) (que comprende células infectadas con virus); o el cultivo completo no procesado.

50 Preferentemente la mezcla de la composición de estabilizador y la composición que comprende un virus de acuerdo con el método de la invención, se realiza poco después de que la producción y el procesamiento aguas abajo han terminado, con el fin de conseguir los mejores resultados de estabilización.

Preferentemente la composición farmacéutica estabilizada obtenida de este modo se almacena posteriormente enfriada o congelada, en espera de procesamiento adicional y los resultados de control de calidad acerca de la recolección de la producción.

55 En realizaciones preferidas del método de acuerdo con la invención:

- el microorganismo es un virus o están comprendidos tanto un virus como una bacteria.
- el virus es al menos una especie viral seleccionada entre el grupo que consiste en herpes-, paramixo-, ortomixo-, adeno-, rabdo-, birna-, corona-, neutro- y poxvirus.
- 60 - el virus se produjo sin componente animal.
- la composición farmacéutica resultante se somete a liofilización.

En una realización más preferida, la invención se refiere a una composición farmacéutica que se puede obtener mediante el método de acuerdo con la invención, en la que la composición es una vacuna.

65

En una realización aún más preferida, la invención se refiere a un método para preparar una solución de vacuna reconstituyendo una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 En una realización alternativa adicional, la invención se refiere al uso de una composición de estabilizador de acuerdo con la invención para estabilizar la calidad y/o la cantidad de al menos un virus en una composición.

En realizaciones preferidas del uso de acuerdo con la invención:

- 10 - el microorganismo es un virus o están comprendidos tanto un virus como una bacteria.  
 - el virus es al menos una especie viral seleccionada entre el grupo que consiste en herpes-, paramixo-, ortomixo-, adeno-, rabdo-, birna-, corona-, neutro- y poxvirus.  
 - el virus se produjo sin componente animal.

- 15 En una realización más preferida la invención se refiere al uso de acuerdo con la invención, de una solución de vacuna de acuerdo con la invención o una solución de vacuna que se puede obtener mediante el método de la invención, para inmunización de un ser humano o animal diana.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

20 Ejemplos

Como se ha mencionado anteriormente, se realizaron experimentos de liofilización que incluyen todas las condiciones en las cuales un estabilizador eficaz tiene que ser capaz de estabilizar: enfriamiento, congelamiento,  
 25 secado, calentamiento.

La descripción general de los experimentos de liofilización realizados en microorganismos estabilizantes fue la siguiente:

- 30 - se obtuvieron composiciones que comprenden microorganismos a partir de un cultivo, se procesaron si era necesario y se almacenaron a 4 °C o por debajo de cero °C.  
 - se preparó una composición de estabilizador de acuerdo con la invención pesando los compuestos requeridos en las cantidades deseadas, añadiendo éstos a un volumen requerido de agua destilada estéril y mezclando hasta disolución. La composición de estabilizador después se esterilizó por calor a 121 °C  
 35 durante 20 minutos.  
 - al comienzo del experimento la muestra se descongeló, se mezcló con un volumen de un estabilizador concentrado 4x que era un tercio del volumen de la muestra. Se usó el estabilizador de acuerdo con la invención o composiciones de estabilizador de referencia. También estuvieron comprendidas muestras sin ningún estabilizador en los experimentos.  
 40 - las muestras estabilizadas se colocaron en viales de vidrio de 10 ml convencionales a un volumen de carga determinado: virus de BVH y PI3 a 2 ml y PRV, mixoma virus, BRSV, EIV y BCoV a 1 ml. Las muestras bacterianas se cargaron a 2,5 ml por vial.  
 - las muestras se liofilizaron usando un programa de dos fases convencional, hasta un contenido de agua residual por debajo del 5% y después se sellaron al vacío con un tapón de goma.  
 45 - posteriormente las muestras se almacenaron a 4 °C o a temperaturas superiores durante un periodo de tiempo determinado; los resultados en las columnas "directo 4 °C" son resultados de titulaciones en muestras almacenadas a 4 °C durante menos de un mes después de la liofilización; los resultados en las columnas "3 días 28 °C" son resultados de titulación de muestras almacenadas a 28 °C durante 3 días posteriormente para almacenamiento posible a 4 °C después de liofilización y después se cuantificaron inmediatamente después de estos 3 días; los resultados en las columnas "1 año 4 °C" son resultados de  
 50 titulación de muestras almacenadas a 4 °C durante al menos un año después de la liofilización.

El almacenamiento a 28 °C durante tres días se incluye como un ensayo de estabilidad acelerado; la mayoría de las veces estos resultados son indicativos de las consecuencias de almacenamiento a lo largo de un tiempo mayor en  
 55 condiciones ambiente o enfriadas.

Con el fin de determinar la cantidad y la calidad del microorganismo que permaneció después de estas condiciones de tratamiento, las muestras de virus se titularon para infectividad y se realizó un recuento de placa de las muestras bacterianas.

60 *Ensayo de titulación de BRSV:*

Muestras estabilizadas de virus BRS se diluyeron en medio de cultivo celular convencional complementado con FCS al 10% (v/v), a diluciones entre 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-7</sup>, en 0,2 ml. Las diluciones se inoculan en células BEL en los pocillos de una placa de microtitulación: 1,5 x 10<sup>5</sup> células BEL/ml, a 0,2 ml/pocillo. Se usaron 10 pocillos por dilución viral. Las  
 65 placas de microtitulación se incubaron durante 8 días (3 – 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Las placas se fijan usando Acetona/PBS

al 70/30% v/v, durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. La monocapa fijada se incuba inicialmente con un anticuerpo monoclonal específico para BRSV y en segundo lugar con un anti-anticuerpo conjugado con FITC + azul de Evans (como tinción de contraste). Aquellas placas en las cuales se han desarrollado células fluorescentes positivas se puntúan como positivas. Los títulos de virus se calculan de acuerdo con Reed y Muench y se expresan como título viral en TCID<sub>50</sub>.

En todos los experimentos se incluyó una muestra de virus convencional homóloga y de control negativo por cada ciclo de titulaciones de virus. Todas las titulaciones de virus se llevaron a cabo por duplicado en un día. Los títulos promediados se presentan.

*Ensayo de titulación de virus de mixoma:*

Células RK13 se siembran en placas de 96 pocillos, a 4 x 10<sup>5</sup> células por ml, a 100 µl por pocillo, en medio de cultivo de células convencional con suero fetal de ternera al 5% (FCS) y antibióticos apropiados. Las placas se incuban durante una noche a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Al siguiente día la muestra estabilizada que contiene mixomavirus se diluye desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup>. 20 µl de cada dilución viral se inoculan en un pocillo de la placa de células RK13, por triplicado. Después de una incubación de una hora a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5%, se añaden 100 µl de medio de cultivo fresco con FCS a los pocillos y las placas se incuban durante 2-3 días adicionales, hasta que son claramente visibles placas virales y se puede leer CPE.

Después las placas se vacían, se tiñen con una dilución de negro Naftaleno y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se vacían nuevamente, se lavan con agua corriente, se secan y se leen usando microscopía de luz.

El número de virus de mixoma infecciosos vivos en la muestra original se calcula mediante el algoritmo de Spearman-Kärber y se expresa como un valor de TCID<sub>50</sub>.

*Ensayo de titulación de virus de BHV, PI3 y PRV:*

Muestras estabilizadas de virus de BHV, PI3 y PRV se titularon de una manera similar a la de virus de mixoma, con la excepción de que para los virus de BHV y PI3 se usaron células JCK y para PRV se usaron células Vero. CPE también se determinó mediante recuento de placas usando microscopía de luz.

*Ensayo de titulación de BCV:*

Una suspensión celular de células MDBK se siembra en placas de 96 pocillos, a 200 µl/pocillo de 1 x 10<sup>5</sup> células/ml en medio DMEM con FCS al 10% y antibióticos apropiados. Las placas se incuban durante 3 días a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de tres días se ha formado una monocapa confluyente. El medio se elimina, se añaden 200 µl de medio fresco sin FCS y las placas se incuban durante 2 horas. Las diluciones de BCV a partir de muestras estabilizadas se preparan en etapas de diluciones decimales. Las placas de microtitulación se vacían nuevamente y las diluciones entre 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-8</sup> se inoculan en la monocapa de células MDBK. Las placas se incuban durante 5-6 días. Las placas virales se visualizan para recuento de inmunofluorescencia, usando un suero anti-BCV de conejo policlonal y un anticuerpo conjugado marcado con FITC anti-conejo de cabra. Después de tinción de contraste con azul de Evans, las placas se recuentan usando microscopía de luz UV. El cálculo del título de TCID<sub>50</sub> viral vivo en la muestra establecida se realiza mediante el algoritmo de Reed-Muench.

*Virus influenza equino*

El EIV se titula en huevos de pollo; las diluciones de una muestra de EIV estabilizadas se inoculan en la cavidad alantoidea de un huevo de pollo de 10 días de edad vivo fertilizado y se incuban a 41-42 °C durante 3-5 días. Los huevos se abren y una muestra de líquido alantoideo se ensaya en ensayo de hemaglutinación usando glóbulos rojos de pollo. La cantidad de EIV infeccioso vivo en la muestra original se calcula a partir de la dilución más elevada que proporciona una reacción de HA.

En algunos experimentos se juzgó la calidad de la torta liofilizada. Esto comprendió inspección visual y agitación del vial.

Se proporcionó una indicación arbitraria:

- + aspecto elegante, estructura firme buena
- 0 aspecto y estructura adecuados
- aspecto y estructura inferior a lo deseado

*Bacterias*

Se obtuvieron cultivos bacterianos cultivando material de reserva en matraces de agitación en medios de cultivo convencionales apropiados. A continuación, estos cultivos se cuantificaron, mediante siembra por duplicado de una serie de muestras de dilución limitante en placas de agar sangre, para recuento del número de colonias que aparecían después de la incubación durante una noche. Para algunos experimentos el número de colonias recuperado después de liofilización se expresó como % del número de colonias en el cultivo original antes de la liofilización.

Los cultivos correspondientes se mezclaron posteriormente 1:4 con una composición de estabilizador concentrada 4x de acuerdo con la invención y se sometieron a un programa de liofilización de dos fases convencional.

Para los experimentos que implican *E. coli*, se usó una cepa K12 y se usaron diferentes medios de cultivo: medio LB convencional, LB con ampicilina y medio agar sangre. La eficacia de la composición de estabilizador de acuerdo con la invención se comparó con la de una albúmina que contenía estabilizador convencional.

Las muestras se ensayaron antes o después de la liofilización o 3 días después de la incubación a 28 ó 30 °C, nuevamente por medio de ensayo de estabilidad acelerado.

**Tabla 5:** Efecto de concentración de Glicina

Microorganismo usado: BHV

Composición de estabilizador usada:

Compuesto		g/l (conc. 4x)
Tampón	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	1
Azúcar	D-Sorbitol	75
Aminoácido	Na-L-Glutamato monohidrato	20
	y Glicina	variable
Poliamina	Tetraclorhidrato de espermina	10

Código de Exp. 03AL	Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)			Calidad de torta	
Glicina g/l	Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización			
		Directo	3 días 28 °C	1 año 4 °C	
240	9,0	8,2	7,9	7,9	0
200		8,4	8,1	7,9	0
160		8,2	8,1	8,2	+
120		8,4	8,1	8,2	0
80		8,4	8,3	8,3	-
40		8,5	7,9	7,8	-
0		8,0	7,7	7,9	-

**Tabla 6:** Efecto de concentración de Glutamato

Microorganismo usado: BHV

Composición de estabilizador usada:

Compuesto		g/l (conc. 4x)
Tampón	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	1
Azúcar	D-Sorbitol	75
Aminoácido	Na-L-Glutamato monohidrato	variable
	y Glicina	160
Poliamina	Tetraclorhidrato de espermina	10



**Tabla 8:** Tipo de sales e hidratos de poliamina y efecto de concentración

Microorganismo usado: BHV

5 Composición de estabilizador usada:

Compuesto		g/l (conc. 4x)
Tampón	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	1
Azúcar	D-Sorbitol	75
Aminoácido	Na-L-Glutamato monohidrato	20
	y Glicina	160
Poliamina	Tetraclorhidrato de espermina	variable
	o dihidrato de espermidina	variable
	o Putrescina*	variable
Referencia	o Etileno diamina	variable

\* estos experimentos comprendían cualquier poliamina o una combinación; esto se indica en la tabla

10 **Tabla 8:** Tipo de sales e hidratos de poliamina y efecto de concentración (continuación)

Código de Exp. 03AL	Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)			
	Tetraclorhidrato de espermina g/l	Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización	
Directo			3 días 28 °C	1 año +4 °C
10	n.d	8,2	8,1	7,9
30		7,8	7,5	7,5

n.d. = no disponible

Código de Exp. 03AL	Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)			
	Dihidrato de espermina g/l	Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización	
Directo			3 días 28 °C	1 año +4 °C
5	9,1	7,8	6,9	7,3
10		7,4	6,7	7,4
30		7,5	6,6	7,1
Tetraclorhidrato de espermina g/l	antes de liofilización	Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
5	9,1	8,1	7,5	7,6
10		8,0	7,7	7,8
30		7,7	7,0	7,4

**Tabla 8:** Tipo de sales e hidratos de poliamina y efecto de concentración (continuación)

Código de Exp. 03AL	Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)			
	Tetraclorhidrato de Espermina  g/l	Título húmedo antes de lío-filización	Título después de lío-filización	
Directo			3 días 28 °C	1 año +4 °C
10	8,5	8,5	7,9	7,8
Putrescina g/l	antes de lío-filización	Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
5	8,5	8,0	7,5	7,3
10		8,1	7,6	7,9
30		8,0	7,5	7,7
Etileno-diamina g/l (Referencia)	antes de lío-filización	Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
5	8,5	8,0	8,0	7,7
10		8,2	7,8	7,9
30		8,2	7,4	8,2
sin poliam.	antes de lío-filización	Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
0	8,5	8,1	7,3	7,4
Combinaciones de poliamida*	antes de lío-filización	Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
A	8,5	8,4	7,8	8,2
B		8,5	8,2	8,2

\* Combinaciones de poliamida:

5

**Tabla 9:** Estabilización de diferentes virus y efecto de poliamina

Composiciones de estabilizador usadas:

10

"Invención 1"

Compuesto		g/l (conc. 4x)
Tampón	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	1
Azúcar	D-Sorbitol	75
Aminoácido	Na-L-Glutamato monohidrato	20
	y Glicina	160
Poliamina	Tetraclorhidrato de espermina	10

"invención 2"

Compuesto		g/l (conc. 4x)
Tampón	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	1
Azúcar	D-Sorbitol	75
Aminoácido	Na-L-Glutamato monohidrato	20
	y Glicina	160
Poliamina	Tetraclorhidrato de espermina	2,5

15

"invención 3" (no un ejemplo de acuerdo con la invención)

Compuesto		g/l (conc. 4x)
Tampón	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	1
Azúcar	D-Sorbitol	75
Aminoácido	Na-L-Glutamato monohidrato	20
	y Glicina	160
Poliamina	ninguna	0

5 Los ejemplos comparativos se realizaron con el estabilizador convencional de técnica anterior (Makoschey *et al.*, mencionado anteriormente), esto se indica como "Estab. Conv.."

**Tabla 9:** Estabilización de diferentes virus y efecto de poliamina (continuación)

		Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)			
virus usado y código de exp.	Estabilizador	Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización		
			Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
BRSV 04.20.001 BD	sin estab.	5,8	4,6	3,5	2,8
	Estab. Conv.		5,6	5,0	5,0
	invención 1		5,5	4,0	5,1
	invención 3		5,0	4,3	n.d.
BRSV 04.20.001 BF	sin estab.	6,2	3,6	3,6	2,6
	Estab. Conv.		5,5,	5,1	5,1
	invención 1		3,6	3,5	3,2
	invención 2		3,5	3,5	3,0
	invención 3		3,5	3,5	n.d.
BRSV 04.20.001 BL	sin estab.	5,8	4,6	4,2	3,4
	Estab. Conv.		5,4	5,2	5,0
	invención 1		n.d.	5,2	5,0
	invención 2		5,4	5,4	5,0
	invención 3		5,3	5,0	n.d.
EIV 03.20.003AA	sin estab.	9,3	7,2	6,5	6,6
	Estab. Conv.		7,4	8,1	8,3
	invención 1		7,9	7,4	7,9
	invención 3		8,0	8,2	n.d.
EIV 03.20.203S	sin estab.	9,1	6,9	5,6	4,3
	Estab. Conv.		8,9	8,3	7,7
	invención 1		8,8	8,3	7,1
	invención 3		8,9	8,4	n.d.

10 n.d. = no disponible

**Tabla 9:** Estabilización de diferentes virus y efecto de poliamina (continuación)

		Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)			
virus usado y código de exp.	Estabilizador	Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización		
			Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
BCV 04.20.800AH	sin estab.	7,0	4,7	<3,5	3,2
	Estab. Conv.		6,1	5,8	5,5
	invención 1		5,7	4,0	4,2
	invención 3		5,6	<3,5	n.d.

		Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)			
		Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización		
virus usado y código de exp.	Estabilizador		Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
BCV 04.20.800AN	sin estab.	6,6	5,9	4,4	3,9
	Estab. Conv.		5,7	5,3	5,1
	invención 1		5,9	5,4	5,2
	invención 2		6,0	5,3	4,9
	invención 3		5,9	5,4	n.d.
Mixoma 04.20.001 R	invención 1	7,9	7,6	n.d.	n.d.
	invención 3		7,7		
PRV 04.20.004AB	sin estab.	9,1	7,3	n.d.	n.d.
	Estab. Conv.		8,3		
	invención 1		8,3		
	invención 3		8,0		
PRV 03.20.003 G	Estab. Conv.	9,0	8,0	7,9	7,9
	invención 1		8,1	7,9	7,9
	invención 3		7,8	7,4	8,0

n.d. = no disponible

5 **Tabla 9:** Estabilización de diferentes virus y efecto de poliamina (continuación)

		Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)			
		Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización		
virus usado y código de exp.	Estabilizador		Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
BHV 03AB	Estab. Conv.	9,1	8,4	8,1	8,0
	invención 1		8,0	7,7	7,8
	invención 3		7,7	6,7	n.d.
BHV 03AE	Estab. Conv.	87	7,7	n.d.	7,5
	invención 1		8,5	8,2	8,4
	invención 3		8,3	8,1	8,2
BHV 03 AN	Estab. Conv.	8,6	8,4	8,1	8,1
	invención 1		8,2	8,1	8,1
	invención 2		8,4	8,5	8,3
BHV 03 AO	sin estab.	8,8	7,6	7,9	n.d.
	Estab. Conv.		8,3	8,1	8,0
	invención 1		8,0	8,2	8,0
	invención 2		7,9	8,2	7,9
	invención 3		7,5	7,9	n.d.
BHV 03 AR	sin estab.	8,9	7,7	n.d.	n.d.
	Estab. Conv.		8,1	8,2	
	invención 1		8,3	8,1	
	Invención 2		8,3	8,1	
	invención 3		8,1	7,5	

n.d. = no disponible

**Tabla 10:** Estabilización de diferentes virus, que se produjeron ACF

Composiciones de estabilizador usadas: "invención 1", invención 3" y estabilizador convencional "Estab. Conv." (véase Tabla 9).					
		Título de virus ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /vial)			
virus ACF usado y código de experimento	Estabilizador de	Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización		
			Directo	3 días 28 °C	1 año +4 °C
PI3 03H	Estab. Conv.	9,5	8,3	8,0	8,1
	invención 1		8,9	8,7	8,6
	invención 3		8,8	8,6	8,5
BHV 03AD	Estab. Conv.	8,8	8,3	7,9	n.d.
	invención 1		8,4	8,0	
	invención 3		8,0	7,8	
PRV 03N	Estab. Conv.	9,3	8,3	8,0	7,7
	invención 1		8,3	8,1	8,1
	invención 3		8,4	7,8	7,2
PRV 03 P	invención 1	n.d.	8,5	8,2	n.d.
	invención 3		8,3	7,8	
Mixoma 04.20.01 L	Estab. Conv.	7,4	7,2	7,4	n.d.
	invención 1		7,2	7,2	

n.d. = no disponible

**Tabla 11:** Reemplazo de glicina por soluto compatible

5

Composiciones de estabilizador usadas:

"invención 3" y "Estab. Conv." (véase Tabla 9)

10 Modificaciones de invención 3: (no de acuerdo con la invención)

Compuesto		g/l (conc. 4x)
Tampón	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	1
Azúcar	D-Sorbitol	75
Aminoácido	Na-L-Glutamato monohidrato	20
	no Glicina	ninguno
Solutos compatibles	Sarcosina	80 ó 160
	o Betaína	80 ó 160
	o Di-glicina	80 ó 160
	o Colina	80 ó 160
Poliamina	ninguno	0

**Tabla 11:** Reemplazo de glicina por soluto compatible (continuación)

virus usado y código de exp.		Estabilizador	Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)	
			Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización
			Directo	3 días 28 °C
BHV 03AC	Estab. Conv.	9,0	8,1	8,1
	invención 3		7,8	7,7
	Invención 3 -/- glicina:			
	+ Sarcosina 80 g/l		7,5	7,5
	+ Sarcosina 160		8,1	7,6
	+ Betaina 80		8,4	7,1
	+ Betaina 160		8,1	7,1
	+ Di-glicina 80		7,9	7,3
	+ Di-glicina 160		8,0	7,7
	+ Colina 80		7,9	6,9
	+ Colina 160		7,5	5,7
PRV 03M	Estab. Conv.	9,0	8,1	7,6
	invención 3		7,6	7,0
	Invención 3 -/- glicina:			
	+ Sarcosina 80 g/l		7,8	7,4
	+ Sarcosina 160		8,2	7,2
	+ Betaina 80		7,2	6,8
	+ Betaina 160		7,4	7,1
	+ Di-glicina 80		7,6	7,4
	+ Di-glicina 160		8,2	8,3
	+ Colina 80		7,3	6,7
	+ Colina 160		7,4	5,7

**Tabla 12:** Efecto de tampón de pH

5

Microorganismo usado: BHV

Composición de estabilizador usada:

10 "invención 3" y "Estab. Conv." (véase Tabla 9)

Modificaciones de estabilizador de "invención 3": (no de acuerdo con la invención)

Compuesto		g/l (conc. 4x)
Tampón	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dihidrato	1
	o Tris HCl - Citrato	50 mM-10 mM
Azúcar	D-Sorbitol	75
Aminoácido	Na-L-Glutamato monohidrato	20
	y Glicina	160
Poliamina	ninguno	0

15 Variaciones de pH se indican en la tabla:

		Título de virus (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /vial)		
		Título húmedo antes de liofilización	Título después de liofilización	
virus usado y código de exp.	Estabilizador			Directo
BHV 03U	Estab. Conv., pH 7,1	8,8	8,0	7,8
	Estab. Conv., pH 7,4		7,6	7,9
	invención 3, pH 6,9		7,9	7,3
	invención 3, pH 7,4		7,9	6,5
	invención 3 -/-fosfato + Tris/Citrato, pH 6,9		8,0	6,9
	invención 3 -/-fosfato + Tris/Citrato, pH 7,4		8,2	6,7

**Tabla 13:** Estabilización de bacterias de *E. coli* (no de acuerdo con la invención).

Microorganismo usado: <i>E. coli</i> K12			
Composición de estabilizador usada: "invención 1" (véase Tabla 9). Para comparación se usó un estabilizador bacteriano convencional que contenía albúmina. Esto se indica como "estab. bac."			
		Unidad deformadora de colonias	
Medio de cultivo	Estabilizador	antes de liofilización	directamente después de la liofilización
LB	estab. bac.	3 x 10 <sup>10</sup>	6,5 x 10 <sup>8</sup>
	Invención 1		2,4 x 10 <sup>9</sup>
LB amp	estab. bac.	3 x 10 <sup>10</sup>	3,5 x 10 <sup>8</sup>
	invención 1		2,4 x 10 <sup>9</sup>
Sangre agar	estab. bac.	2,7 x 10 <sup>11</sup>	3,4 x 10 <sup>9</sup>
	invención 1		2,1 x 10 <sup>10</sup>

5

**Tabla 14:** Estabilización de diferentes bacterias (no de acuerdo con la invención).

Microorganismo usado: Bacterias diferentes				
Composición de estabilizador usada: "invención 1" e "invención 3" (véase Tabla 9). Para comparación se usó un estabilizador bacteriano convencional que contenía albúmina. Esto se indicó como "estab. bac."				
		% de recuperación		Calidad de la torta
Bacteria, USC de partida/ml	Estabilizador	directo después de liofilización	después de 3 días 28 °C	
<i>E. coli</i> K12, 2,4 x 10 <sup>9</sup>	ninguno	13	9	-
	invención 1	33	1	0
	invención 3	48	9	0
<i>Salmonella gallinarum</i> , 4,0 x 10 <sup>9</sup>	ninguno	24	16	-
	invención 1	18	14	+
	invención 3	34	17	+
	estab. bac.	100	57	+
<i>Streptococcus equi</i> , 1,2 x 10 <sup>9</sup>	ninguno	56	27	0
	invención 1	60	6	0
	invención 3	39	15	+
	estab. bac.	58	29	+
<i>Staphylococcus carnosus</i> , 2,4 x 10 <sup>9</sup>	ninguno	57	65	0
	invención 1	64	67	0
	invención 3	61	57	0

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar una composición de estabilizador con una composición que comprende al menos un microorganismo, en el que dicha composición de estabilizador comprende al menos un aminoácido, al menos un azúcar y al menos una poliamina, **caracterizado por que** todos los compuestos de dicha composición de estabilizador están definidos químicamente y en el que dicha poliamina es al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en cadaverina, putrescina, espermidina y espermina y en el que dicho microorganismo es un virus.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la composición de estabilizador el azúcar es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, sorbitol y manitol.
- 15 3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que en la composición de estabilizador el aminoácido es glutamato o glicina o en la que están comprendidos ambos de estos aminoácidos.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el virus es al menos una especie viral seleccionada entre el grupo que consiste en herpes-, paramixo-, ortomixo-, adeno-, rabdo-, birna-, corona-, neum- y poxvirus.
- 20 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el microorganismo se produjo sin componente animal.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la composición farmacéutica resultante se somete a liofilización.
- 25 7. Composición farmacéutica que se puede obtener mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha composición es una composición de vacuna.